

在人类所受的天然辐射中 50%以上来源于氦及其子体 粒子, 粒子作为一种辐射致癌因子主要是引发肺癌^{1,2}。正常细胞转化为癌细胞是多种基因突变与表达改变和多阶段累积变化的结果,因此获得细胞恶性转化不同时期差异表达的基因对于揭示癌症的发生机制具有重要意义。本研究以经 粒子照射诱导转化的人支气管上皮细胞(BEP2D)为材料,采用抑制消减杂交技术,分别建立了 BEP2D 细胞恶性转化不同时期差异表达基因的文库,并对文库中部分克隆进行了测序分析。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

永生化 BEP2D 细胞系由 Harris CC 教授提供,用 HLC-8 无血清培养液于 5%的 CO₂ 培养箱中 37 培养。R15H 细胞为本实验室用 1.5 Gy 粒子照射 BEP2D 细胞后诱导建立的转化细胞系,照射后 20 代龄细胞(R15Hp20)具有形态学转化特征,但接种于裸鼠不成瘤;35 代龄细胞(R15Hp35)开始癌变,细胞接种于裸鼠后成瘤,病理学分为鳞癌。

1.2 细胞总 RNA 提取

细胞常规培养达指数生长期 2 × 10⁶ 时,采用 Trizol (Gibco) 试剂分别提取永生化 BEP2D 细胞、照射后 R15Hp20 和 R15Hp35 细胞的总 RNA。

1.3 抑制消减杂交(SSH)

具体操作按 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 和 Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtractive Kit 说明书进行。3 个文库的差减方案为:A 差减文库是以 BEP2D 细胞的 cDNA 为 Tester, R15Hp35 细胞的 cDNA 为 driver 进行差减杂交;B 差减文库是以 R15Hp20 细胞的 cDNA 为 tester, BEP2D 和 R15Hp35 细胞的 cDNA 混合在一起作为 driver 进行差减杂交;C 差减文库是以 R15Hp35 细胞的 cDNA 为 tester, BEP2D 细胞的 cDNA 为 Driver 进行差减杂交。

1.4 差减 cDNA 文库的构建(T/A 克隆法)

从 PCR 扩增后的 A、B、C 差减基因产物中分别取出 3 μl,与 1 μl pGEM-T 载体连接,4 过夜。从连接体系中取 4 μl 转化受体菌 DH5,接种于 X-gal/IPTG Amp 琼脂平板上培养,挑取白色克隆在 5 ml LB 培养基中 37 振荡培养过夜,加 15%甘油,液氮速冻,-70 保种。

1.5 文库的筛选

从上述保存的部分细菌中,提取质粒作为模板,

以 pGEM-T 的一对通用引物 T7/SP6 扩增外源插入片段。取 4 μl 反应产物在 1.0%琼脂糖凝胶中电泳,观察有无特异扩增片段。

1.6 cDNA 片段测序和 DNA 序列分析

随机挑取 A 库中 22 个克隆、B 库中 20 个克隆、C 库中 28 个克隆,测序后用 BLAST 软件搜索 GenBank 中同源序列进行比较。

2 结果

2.1 差减 cDNA 文库构建

运用 SSH 技术,A、B、C 3 个差减 cDNA 文库获得的克隆数如表 1 示。

表 1. 细胞恶性转化不同时期差减文库克隆数

Table 1. The number of clones in different malignant transformed cells

Name of library	Driver	Tester	Number of clones
A subtraction library	R15Hp35 cDNA	BEP2D cDNA	416
B subtraction library	R15Hp35 + BEP2D cDNA	R15Hp20 cDNA	301
C subtraction library	BEP2D cDNA	R15Hp35 cDNA	586

2.2 扩增结果

以 pGEM-T 载体两端的一对通用引物 T7/SP6 扩增了 1 302 个克隆的外源插入片段。经 1.0%琼脂糖电泳鉴定,除其中 13 个克隆没有扩增出插入片段外,其余克隆都得到了特异扩增片段,外源插入片段的大小大部分介于 500~1 000bp 之间,平均大小在 750 bp 左右(图 1),与 SSH 设计预期的插入片段大小吻合³。

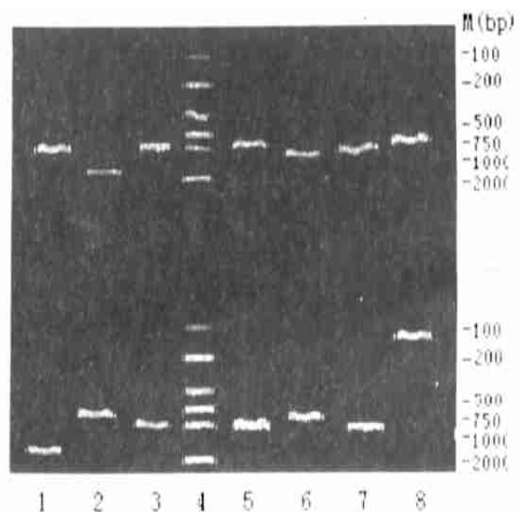


图 1. 部分 PCR 电泳结果

Figure 1. Electrophoretogram of some PCR clone products

1~3, 5~8: 部分克隆 PCR 产物

Lane 1~3, 5~8: PCR product of part clones
 4 2 000 bp DNA marker
 Lane 4 2 000 bp DNA marker

2.3 cDNA 片段测序和 DNA 片段分析

对 70 个 cDNA 克隆进行单向测序并与 GenBank 中序列进行了比较,除其中 9 个未查到同源序列外,其他 61 个克隆代表了 56 个不同的已知基因(表 2),其中 11 个为重复检出基因。A 库中有 2 个克隆为重复检出的同一基因,B 库中有 3 个克隆为重复检出的同一基因,C 库中有 2 个克隆为重复检出的过膜转运

蛋白 TMP21 基因,另 2 个克隆为重复检出的肌动蛋白 ARPC3 相关基因:也就是说差减库中约 86 % 的克隆代表着不同的基因,表明 cDNA 差减群体内部很少重复拷贝,不同基因间丰度的差异得到了很好的均衡。56 个 cDNA 克隆中 48 个为已知的人类基因,8 个与其他物种基因氨基酸序列同源性达 60 % ~ 90 %。剩下的 9 个 cDNA 从 GenBank 中查不到任何对应的同源序列克隆,分析可能有两种情况: 代表了新基因; 克隆的 cDNA 序列位于基因变异丰富的 3 端故而无法查到与其他物种基因的同源性。

表 2. 61 个 cDNA 克隆
 Table 2. 61 cDNA clones

Number of clone ^{a)}	Shortened title	Full title
A191	HDAC1	histone deacetylase 1 (XM 001767. 1)
A197	-	zinc finger protein homologous to Zfp95 in mouse (NM 014569. 1)
A195	-	malignant brain tumor (1(3)mbt) protein (AL031681. 16)
A210	LSR68	lipopolysaccharide specific response-68 protein (gb AC006146. 2)
A414	-	tyrosine 3-monooxygenase activation protein (ref NM 003406. 1)
A302	-	importin beta subunit mRNA (gb L38951. 1)
A303	-	Lepilemur dorsalis genomic fragment clone A9c (emb AJ244005. 1)
A318/ A170	NFE2L2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (ref XM002548. 1)
A192	-	chromosome 6p21. 31-22. 2 (emb AL033520. 16)
A198	-	U6 snRNA-associated Snr-like protein LSm3 (gb AF182289. 1)
A199	-	weakly similar to HES1 protein (dbj AK023226. 1)
A14	-	tetracycline efflux protein (gb U07168. 1)
A15	CAPZA1	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1 (NM_ 006135)
A19	RPL23	ribosomal protein L23 (Ref/ XM_ 008149/)
A230	-	similar to 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase (dbj AK025736. 1)
A383	GRY-RBP	RRM RNA binding protein (gb AF037448. 1)
A377	PSA	similar to phosphoserine aminotransferase (dbj AK025460. 1)
A286	DDB1	Rattus norvegicus of damage-specific DNA binding protein 1 (emb AJ277077. 2).
A383	-	KIAA1252 protein (dbj AB033078. 1)
A201	-	DNA from overlapping chromosome 19 (gb AC002115. 1)
A275	-	DNA sequence from clone RP11-416N2 on chromosome 10 (emb AL121929. 17)
B89	KCNJ2	inwardly-rectifying potassium channel Kir2. 1 (AF153820. 1)
B173	-	translation initiation factor eIF-2alpha (U26032. 1)
B70	-	KIAA1235 protein (dbj AB033061. 1)
B157	-	kidney 2 pooled tumors (gb AA393850. 1)
B175	CCT6A	chaperonin containing TCP1, subunit 6A (ref NM_ 001762. 1)
B171	-	PRO2975 (gb AF119911. 1)
B129/ B130/ B144	CAPZA1	capping protein (actin filament) muscle Z-line. alpha 1 (ref NM_ 006135. 1)
B142	-	similar to H. sapiens 4B cDNA (emb X55733. 1)
B143	-	splicing factor (CC1. 3) (ref XM_ 009458. 1)
B150	NUCKS	similar to rat nuclear ubiquitous casein kinase 2 (ref NM_ 022731. 1)
B170	-	elongation factor 1-alpha (emb X16869. 1).
B21	-	Xp22 BAC GSHB 526D21 (gb AC003037. 1)

Number of clone ^{a)}	Shortened title	Full title
B58	-	KIAA1557 protein (dbj AB046777. 1)
B27	DNMT3A	(cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha (ref NM-022552. 1)
B173	-	translation initiation factor eIF-2alpha (gb U26032. 1)
C7	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (X16869. 1)
C29	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease (NM_ 001225)
C35	-	cytochrome C oxidase subunit (gi 10439415)
C37	TP53	phosphoprotein p53 gene (M13121. 1)
C42/ C59	TMP21	transmembrane trafficking protein (XM_ 007423. 1)
C252	COII	cytochrome oxidase subunit (M25171. 1)
C253	NET1A	guanine nucleotide regulatory protein (NM-005863)
C256	USP8	ubiquitin specific protease 8 (NM_ 005154. 1)
C258	SRP9	signal recognition particle gkD (NM_ 003133. 1)
C540	-	transamidase (AF022913. 1)
C250	-	MEMD protein (Y10183. 1)
C539	-	TF-227H (dbj AK026634. 1)
C205/ C571	ARPC3	actin related protein 2/ 3 complex, subunit 3 (gi 10719884)
C254	NARS	Asparaginy1-tRNA synthetase (ref NM-008783. 1)
C218	HPCL1	2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase (ref NM_ 012260. 1)
C31	-	mitochondrion genome (ref NC_ 001807. 2)
C215	ARC21	arp2/ 3 protein complex subunit p21-Arc (ref NM_ 005719. 1)
C34	POLR2G	polymerase (RNA) polypeptide G (NM_ 002696)
C219	RPS27A	ribosomal protein S27a (ref XM_ 002255. 1)
C207	-	KIAA1352 protein (dbj AB037773. 1)

a) :A ,B ,C represent the clone of A ,B ,C library respectively.

3 讨论

BEP2D 细胞是经 HPV18 转染人支气管上皮细胞后获得的永生化的恶性前细胞,该细胞经 1.5 Gy 粒子照射并连续培养至 20 代时开始出现细胞形态学的改变:细胞间失去接触抑制,呈密集复层生长,细胞骨架排列紊乱,细胞增大且出现异形性,核质比例增大,核仁突出且异形,细胞器发达,体外生存能力增强,可在软琼脂中形成克隆,接种裸鼠不成瘤等,这说明细胞发生了形态学转化。第 35 代时细胞接种裸鼠后成瘤,组织切片证实该瘤为人上皮来源的鳞癌,说明细胞已发生恶性转化。由此推测 BEP2D 细胞体外恶性转化与体内癌症的发生一样,是一个渐进的多阶段的连续发展过程。因此以该细胞系为对象进行研究,对于深入了解癌症发生、发展和恶性转化的分子机制具有重要价值。据该细胞的这种生长特性,我们分别选取了永生化的 BEP2D 细胞、粒子照射后 20 代和 35 代转化细胞为材料。

实验分离克隆到几个重要的 cDNA 序列,如在 35 代恶性转化细胞中克隆到的参与肿瘤细胞转移和粘附的 MEMD (克隆 C250) 和 TF-227H (克隆 C539) 基

因^{4,5},参与细胞增殖的 USP8 (克隆 C256)⁶ 基因等。这一方面证实了 35 代细胞的恶性转化特征,另一方面也预示了该细胞可能具有转移生长的倾向。另外,在 20 代细胞中克隆到的翻译起始因子 eIF-2alpha (克隆 B173)⁷ 等可能与细胞恶性转化的进展有关,而在永生化的 BEP2D 细胞中克隆到的与恶性脑肿瘤致死同源基因、组蛋白脱乙酰基基因 HDAC1 (克隆 A191) 等同源的基因亦可能与细胞的转化有关。其他如细胞色素氧化酶 亚单位、锌指结合蛋白同源基因、鸟嘌呤调节蛋白、转氨酶基因、真核细胞翻译延伸因子、凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶基因、跨膜运输蛋白基因、细胞周期调节相关基因等等,在不同文献中分别被报道涉及基因表达调控。信号传导、物质能量代谢、细胞增殖分裂等等细胞恶性转化生命进程。据此推测,BEP2D 细胞从正常生长转为恶性增殖生长涉及大量的基因表达调控事件,不仅有重要的转录因子活跃其中,而且存在丰富的信号传导和物质、能量代谢。

本实验对 SSH 在肺癌发生机制研究领域的应用进行了尝试,将 SSH 用于分离细胞恶性转化不同时

文章编号:1004 - 616X(2002)01 - 0005 - 05

论著 ·

-粒子诱发人 BEP2D 恶性转化细胞的亚克隆及 DNA 链断裂修复研究

隋建丽,刘秀林,胡迎春,程 昕,金瑾珍,周平坤*,吴德昌*

(军事医学科学院放射医学研究所放射毒理研究室,北京 100850)

【摘要】目的:建立 γ -粒子诱发人支气管上皮细胞(BEP2D)恶性转化细胞的克隆细胞系,研究其核型和 DNA 链断裂修复能力。方法:1.5 Gy γ -粒子照射的 BEP2D 细胞传 35 代后接种裸鼠成瘤,取出瘤细胞进行亚克隆,挑出单个克隆扩大培养,G 带显示分析细胞核型,脉冲电场凝胶电泳法检测 DNA 双链断裂。结果:亚克隆了 5 个恶性转化细胞系(RP35T-1,-2,-4,-5,-6),核型基本与 BEP2D 细胞相近,但有着不同的染色体缺失,其中 2 株细胞(RP35T-2 和 RP35T-4)多倍体高达 40%,明显高于 BEP2D 细胞。恶性转化细胞 RP35T-1 和 RP35T-4 的 DNA 双链断裂重接修复缺陷。结论:建立了 γ -粒子诱发人 BEP2D 恶性转化细胞的克隆细胞系,DNA 链断裂修复缺陷可能是 γ -粒子致癌的一个重要特点。

【关键词】人支气管上皮细胞; γ -粒子;癌变;核型;DNA 修复

中图分类号:R811.5

文献标识码:A

SUB-CLONING OF MALIGNANT TRANSFORMANTS OF BEP2D INDUCED BY γ -PARTICLES AND THEIR CAPACITY OF REJOINING DNA DOUBLE-STRAND BREAKS

SUI Jian-li, LIU Xiu-lin, HU Ying-chun, CHENG Xin, JIN Cui-Zhen, ZHOU Ping-kun*, WU De-chang*
(Department of Radiation Toxicology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

期差异表达的基因,获得初步的成功。当两个待比较的 RNA 群体间差异表达基因数量较为丰富时,SSH 方法优势明显,一次可以克隆到多个不同丰度的差异表达基因;但当两个待比较的 RNA 群体间差异不大时,所建 cDNA 差减库中可能含有大量的背景克隆,给真正差异基因的分离带来较大干扰。在肿瘤的研究中,SSH 特别适合于研究细胞转化早期差异表达的基因。因为在转化早期可能有一些低丰度的调控因子参与其中,更能体现 SSH 分离低丰度差异基因的优势。对 3 个库中其他基因的进一步筛选、鉴定、分析以及功能的研究将是我们下一步工作的重点。

参考文献

- 1 Cox R. Molecular mechanisms of radiation oncogenesis. *J. Int J Radiat Biol*, 1994, 65 (1): 57 ~ 64.
- 2 吴德昌. 氩及子体生物危害的研究 M. 辐射防护, 1996, 16: 321

~ 329.

- 3 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *J. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6 025 ~ 6 030.
- 4 Degen WG, van Kenpen LC, Gijzen EG et al. MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leucine molecule). *J. Am J Pathol*, 1998, 152(3): 805 ~ 813.
- 5 Ishiguro T, Nagawa H, Naito M, et al. Analysis of novel metastasis-associated gene TF-227J. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(4): 390 ~ 394.
- 6 Ann DK, Wu MM, Huang T, et al. Retinol-regulated gene expression in human tracheobronchial epithelial cells. Enhanced expression of elongation factor EF-1 alpha. *J. Biol Chem*, 1988, 263(8): 3 546 ~ 3 549.
- 7 Naviglio S, Matteucci C, Matoskova B, et al. UBPY: a growth-regulated human ubiquitin isopeptidase. *J. EMBO J*, 1998, 17: 3 241 ~ 3 250.

收稿日期:2001 - 05 - 29; 修订日期:2001 - 07 - 02

基金项目:“十五”军队医学杰出中青年基金、国家自然科学基金(39870214)、国家重点基础研究发展规划(973)(G1998051207)

作者简介:隋建丽(1951-),女,山东荣城人,高级实验师,大专,从事细胞生物学与基因毒理研究。